
1/34/6 (Item 2 from file: 351)

008728321

WPI Acc No: 1991-232336/199132

Measurement of urea or urease in biological fluids - by mixing with pH indicator and urease or urea

Patent Assignee: CENT HOSPIT REG UNI (HOSP-N)

Inventor: ORSONNEAU J L

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

| Patent No | Kind | Date | Applicat No | Kind | Date | Week |
|------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| FR 2654436 | A | 19910517 | FR 8914907 | A | 19891114 | 199132 B |

Priority Applications (No Type Date): FR 8914907 A 19891114

Abstract (Basic): FR 2654436 A

Urea or urease is measured in liqs., partic. biological fluids, by the following methods: the fluid is mixed with a first reagent contg. a stable dye the colour of which varies with pH in the range 5.5-9, it is then mixed with a second reagent contg. urea or urease which ever one is not present in the test soln.. The optical density of the mixt. is then measured at the same wavelength of visible light before and after hydrolysis due to the action of the urease. The difference is compared with the result obtained with standard solns. and so the concn. of urea or urease is calculated.

ADVANTAGE - This process is cheap and simple to carry out, may be effected on urine samples without interference from ammonia present, and it does not require pre-treatment of the sample soln.. (16pp Dwg.No.0/0)

Derwent Class: B04; D16; J04; S03; S05

International Patent Class (Additional): C12Q-001/58; G01N-021/79; G01N-033/62

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2003 Thomson Derwent. All rights reserved.

1/34/7 (Item 3 from file: 351)

008489291

WPI Acc No: 1990-376291/199051

Detection of urease in endoscopic biopsies - by colour change of urea soln. contg. phenol red indicator

Patent Assignee: ISERHARD R (ISER-I)

Inventor: ISERHARD R

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

| Patent No | Kind | Date | Applicat No | Kind | Date | Week |
|------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| BR 8902699 | A | 19901120 | BR 892699 | A | 19890519 | 199051 B |

Priority Applications (No Type Date): BR 892699 A 19890519

Abstract (Basic): BR 8902699 A

The enzyme urease performed in endoscopic biopsies of gastro-duodenal mucous membrane by bacterial action, is detected by immersing the biopsy specimen in a gelatinous soln. contg. peptone 1.0 g/l., glucose 1.0, sodium chloride 5, monobasic K phosphate 2, Phenol Red 0.012, urea 20, Metronidazol 0.002, Gentamicine 0.24 and agar-agar

12 g/l., in dist. water, in presence of urease, ammonia and bicarbonate are liberated, raising the pH from 5.8 to over 6.0 and changing the colour of the gel from pale yellow to red. The anti-bacterial agents prevents contamination by bacteria from biopsy equipment

Derwent Class: B04; D16; J04
International Patent Class (Additional): C12Q-001/58

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2003 Thomson Derwent. All rights reserved.

1/34/8 (Item 4 from file: 351)

008270474

WPI Acc No: 1990-157475/199021

Anhydrous analytical unit for diagnostic determin. of ureasestem - in samples of gastric mucosa, comprising urea, buffer and opt. indicator, esp. in tablet form

Patent Assignee: ROEHM PHARMA GMBH (ROHG)

Inventor: KLEIN C J; MANN H; ROTHGANG G

Number of Countries: 011 Number of Patents: 001

Patent Family:

| Patent No | Kind | Date | Applicat No | Kind | Date | Week |
|-----------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| EP 369292 | A | 19900523 | EP 89120602 | A | 19891107 | 199021 B |

Priority Applications (No Type Date): DE 88U14264 U 19881115

Cited Patents: EP 204438; US 3527674; US 4101382

Patent Details:

| Patent No | Kind | Lan | Pg | Main IPC | Filing Notes |
|-----------|------|-----|----|----------|--------------|
|-----------|------|-----|----|----------|--------------|

| | | | | | |
|-----------|---|--|--|--|--|
| EP 369292 | A | | | | |
|-----------|---|--|--|--|--|

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE.

Abstract (Basic): EP 369292 A

In an analytical unit for urease determin. using a reagent consisting of urea, buffer for pH 5-7.5 and pH indicator which changes colour at 5.5-8.5 (which must be above the pH of the buffer), the unit is free of water and contains an adequate amt. (for a urease assay) of urea and/or the buffer.

The unit may also contain a germicide, the indicator and an inert extender. It is pref. formulated as a tablet of wt. below 1, pref. below 0.5 g, and may be enclosed within a sealed container.

USE/ADVANTAGE - Determn. of urease in biopsy samples of gastric mucosa is used to diagnose Campylobacter pyloridis infections. These units are easy to prepare, handle and package and have unlimited storage life. (7pp Dwg.No.0/3)

Derwent Class: B04; D16; J04

International Patent Class (Additional): C12Q-001/58

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2003 Thomson Derwent. All rights reserved.

1/34/6 (Item 2 from file: 351)

008728321

WPI Acc No: 1991-232336/199132

Measurement of urea or urease in biological fluids - by
mixing with pH indicator and urease or urea

Patent Assignee: CENT HOSPIT REG UNI (HOSP-N)

Inventor: ORSONNEAU J L

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

| Patent No | Kind | Date | Applicat No | Kind | Date | Week |
|------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| FR 2654436 | A | 19910517 | FR 8914907 | A | 19891114 | 199132 B |

Priority Applications (No Type Date): FR 8914907 A 19891114

Abstract (Basic): FR 2654436 A

Urea or urease is measured in liqs., partic. biological fluids, by the following methods: the fluid is mixed with a first reagent contg: a stable dye the colour of which varies with pH in the range 5.5-9, it is then mixed with a second reagent contg. urea or urease which ever one is not present in the test soln.. The optical density of the mixt. is then measured at the same wavelength of visible light before and after hydrolysis due to the action of the urease. The difference is compared with the result obtained with standard solns. and so the concn. of urea or urease is calculated.

ADVANTAGE - This process is cheap and simple to carry out, may be effected on urine samples without interference from ammonia present, and it does not require pre-treatment of the sample soln.. (16pp Dwg.No.0/0)

Derwent Class: B04; D16; J04; S03; S05

International Patent Class (Additional): C12Q-001/58; G01N-021/79;
G01N-033/62

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 654 436

(21) N° d'enregistrement national :

89 14907

(51) Int Cl⁸ : C 12 Q 1/58; G 01 N 21/79, 33/62

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 14.11.89.

(71) Demandeur(s) : CENTRE HOSPITALIER REGIONAL
ET UNIVERSITAIRE DE NANTES — FR.

(30) Priorité :

(72) Inventeur(s) : Orsonneau Jean-Luc.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 17.05.91 Bulletin 91/20.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : Se reporter à la fin du présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Lemonnier Dawidowicz.

(54) Procédé pour le dosage de l'urée et de l'uréase, et coffret des réactifs nécessaires pour la mise en œuvre de ce procédé.

(57) L'invention concerne un procédé pour le dosage de l'urée, ou de l'uréase dans les milieux liquides, en particulier dans les fluides biologiques.

Selon l'invention, on mélange l'échantillon renfermant respectivement l'urée à doser ou l'uréase à doser avec un premier réactif essentiellement constitué par une solution aqueuse d'un composé chimique qui est stable dans ladite solution au moins pendant la durée du dosage, dont la coloration varie en fonction du pH, dans la plage de pH allant d'environ 5,5 à environ 9, ladite solution renfermant le cas échéant respectivement de l'uréase ou de l'urée, ladite uréase ou urée étant, dans la négative, ajoutée ultérieurement sous la forme d'une solution aqueuse et constituant alors un second réactif, et on déduit la concentration respectivement de l'urée ou de l'uréase recherchée de la différence des mesures de la densité optique de l'échantillon à une même longueur d'onde du spectre visible effectuées avant et après l'action d'hydrolyse par l'uréase, cette différence étant comparée au résultat obtenu, dans les mêmes conditions, avec une solution étalon respectivement d'urée ou d'uréase.

Application au dosage de l'urée ou de l'uréase.

FR 2 654 436 - A1



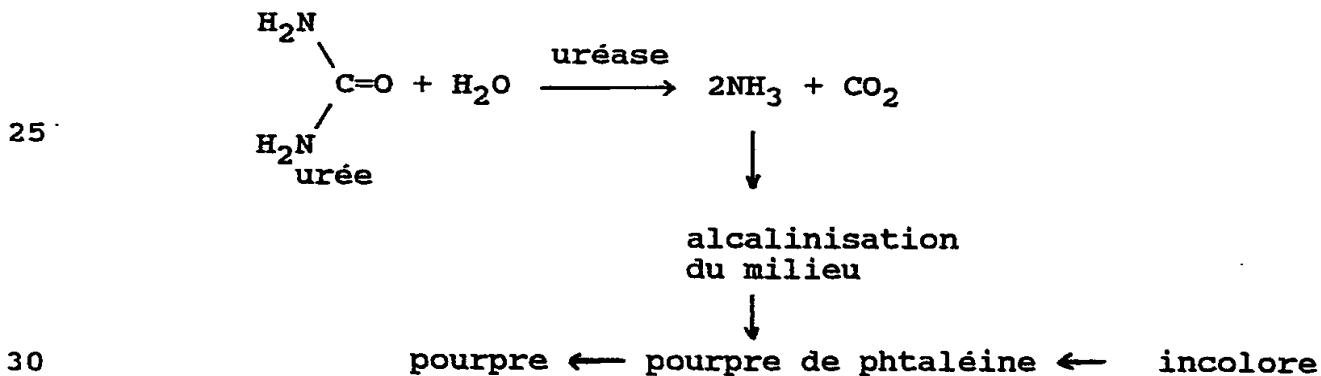
5 La présente invention porte sur un procédé pour le dosage de l'urée et de l'uréase dans les milieux liquides, en particulier dans les liquides biologiques, tels que le sang, les urines, etc. Le dosage de l'uréase est intéressant en immunoenzymologie, l'uréase étant fixée à un
10 anticorps ou à un antigène, ou en biologie moléculaire, l'uréase étant alors fixée à une sonde nucléique ADN ou ARN non-radioactive. L'invention porte également sur les coffrets des réactifs nécessaires pour la mise en oeuvre de ce procédé.

15 Le dosage de l'urée s'effectuait traditionnellement par les méthodes purement chimiques à l'hypobromite, au xanthydrol, au paradiméthylaminobenzaldéhyde, à la diacétyle monoxime et à l'orthophtalaldéhyde. Dans l'ensemble, ces méthodes ne sont plus utilisées. Les méthodes au diacétyle monoxime et à l'orthophtalaldéhyde qui le sont encore sont peu spécifiques et elles sont sujettes à de nombreuses interférences. De plus, leur emploi est souvent malaisé, car elles nécessitent une température d'utilisation élevée et elles posent des problèmes de corrosion et de
20 conservation.

25 Les méthodes chimiques classiques pour le dosage de l'urée dans les milieux biologiques ont été supplantées par les méthodes enzymatiques, effectuant un dosage d'ammoniac après hydrolyse de l'urée par l'uréase ; ce sont la réaction de Nessler, la réaction de Berthelot et la titration avec la cellule de Conway, la mesure différentielle de pH, l'électrode spécifique à l'ammoniac, et la méthode enzymatique totale à la glutamate deshydrogénase. Cette dernière, qui est de très loin la plus utilisée, est très spécifique, précise et très sensible. Elle présente cependant un certain nombre d'inconvénients :

- elle est coûteuse ;
- la stabilité du réactif est relativement faible ;
- elle nécessite un équipement permettant de faire des mesures de densité optique dans l'ultraviolet (340 nanomètres), étant donc difficilement applicable dans les pays où les moyens techniques et économiques sont modestes ;
- elle est difficilement utilisable pour les urines, car elle est sujette à l'interférence de l'ammoniac préexistant et, trop sensible, elle nécessite une dilution des urines car la concentration en urée y est trop importante. Ce pré-traitement des urines est très pénalisant pour des dosages en séries.

La présente invention vise à remédier à l'ensemble de ces inconvénients. A cet effet, selon l'invention, on propose de doser l'urée sur la base de la variation de la densité optique, après hydrolyse de l'urée par l'uréase, du milieu contenant l'urée et un composé chimique dont la coloration varie en fonction du pH (désigné parfois ci-après simplement par le terme «colorant»). Le schéma réactionnel est le suivant, le colorant étant le pourpre de phtaléine :



Un tel procédé convient entre autres très bien pour le dosage de l'urée dans les urines. Sa mise en oeuvre est simple, ne comportant que le mélange de l'échantillon à doser avec un ou deux réactifs, sans nécessiter de chauffage. Ces réactifs sont stables pendant plusieurs semaines et ils ne sont pas corrosifs. En outre, le procédé

est spécifique de l'urée, sa spécificité étant celle de l'uréase ; il est fiable dans les conditions normales d'utilisation ; il ne nécessite pas d'équipement coûteux puisque la mesure de densité optique est faite dans le spectre visible, une estimation pouvant même être faite à l'œil nu ; et il est d'un coût très sensiblement inférieur aux procédés actuels.

En outre, conformément à l'invention, l'uréase peut être dosée par réaction inverse, l'urée se trouvant à taux connu dans le réactif et l'uréase se trouvant dans l'échantillon. Ce type de dosage est intéressant dans deux cas :

- en immunoenzymologie, l'uréase étant fixée à un anticorps ou à un antigène. L'anticorps (ou antigène) étant spécifique d'une autre molécule (hormone, protéine, médicament ...), il est possible de déterminer quantitativement cette molécule par le biais de la réaction urée-uréase-composé chimique dont la coloration change en fonction du pH ;
- en biologie moléculaire, l'uréase étant cette fois fixée à une sonde nucléique ADN ou ARN non-radioactive. La sonde étant spécifique de son brin complémentaire, il est alors possible de la détecter ou de la doser, toujours par la même réaction. Cette méthode peut alors permettre la détection de virus ou de bactéries dans les milieux biologiques et dans les produits alimentaires, le dépistage des maladies génétiques, et d'aider au diagnostic et au traitement dans les cancers.

La présente invention a donc d'abord pour objet un procédé de dosage de l'urée, ou de l'uréase, dans les milieux liquides, en particulier dans les milieux biologiques, caractérisé par le fait qu'on mélange l'échantillon renfermant respectivement l'urée ou l'uréase à doser avec un premier réactif essentiellement constitué par une solution aqueuse d'un composé chimique qui est stable dans ladite

5 solution au moins pendant la durée du dosage et dont la coloration varie en fonction du pH, dans la plage de pH allant d'environ 5,5 à environ 9, ladite solution renfermant le cas échéant respectivement de l'uréase ou de l'urée, 10 ladite urée ou uréase étant, dans la négative, ajoutée ultérieurement sous la forme d'une solution aqueuse et constituant alors un second réactif, et on déduit la concentration respectivement de l'urée ou de l'uréase recherchée de la différence des mesures de la densité optique de l'échantillon à une même longueur d'onde du spectre visible, effectuées avant et après l'action d'hydrolyse par l'uréase, cette différence étant comparée au résultat obtenu, dans les mêmes conditions, avec une 15 solution étalon respectivement d'urée ou d'uréase.

15 Conformément à un premier mode de réalisation :

- dans une première étape, on mélange l'échantillon renfermant respectivement l'urée à doser ou l'uréase à doser avec un premier réactif essentiellement constitué par une solution aqueuse du composé chimique dont la 20 coloration varie en fonction du pH, dans la plage de pH allant d'environ 5,5 à environ 9, ladite solution renfermant le cas échéant respectivement de l'uréase ou de l'urée ;
- dans une seconde étape, on mesure la densité optique de 25 l'échantillon ;
- dans une troisième étape, conduite dans le cas où le premier réactif ne contenait pas respectivement d'uréase ou d'urée, on ajoute à l'échantillon à traiter, un second réactif constitué par une solution aqueuse respectivement d'uréase ou d'urée ; et
- dans une quatrième étape, on mesure à nouveau la 30 densité optique de l'échantillon à la même longueur d'onde ; et
- on déduit la concentration respectivement d'urée ou 35 d'uréase recherchée.

Le colorant selon l'invention doit être soluble en

milieux aqueux dans la plage de pH correspondant à celle de l'action de l'uréase (environ 5,5-9), et il doit être stable dans ce milieu au moins pendant la durée du dosage, soit, de préférence, pendant au moins quelques heures. De plus, le 5 changement de couleur ne doit être ni trop rapide ni trop bref. Ce colorant peut être un complexant métallique, comme le pourpre de phtaléine, le rouge de pyrogallol, le bleu de méthyl thymol, le pourpre de bromocrésol, le bleu de toluidine, le bleu d'aniline, ou un indicateur coloré de pH, 10 comme l'hématoxyline, le tournesol, le nitro-4 phénol, le bleu de bromoxylénol, l'alizarine, le bleu de bromothymol, le pourpre de crésol, la phénolphtaléine ; on peut également utiliser un mélange de ces composés.

La solution aqueuse constituant le premier réactif 15 peut avantageusement renfermer au moins un agent complexant, comme l'EDTA, le NTA, en une quantité suffisante pour éviter toute interférence avec des métaux éventuellement présents dans le milieu.

Cette solution aqueuse constituant le premier 20 réactif peut être plus ou moins tamponnée en fonction de la sensibilité désirée (moins elle est tamponnée, plus la variation de coloration est importante pour une même quantité d'urée (ou d'uréase)).

25 (a) Dosage de l'urée

Dans le dosage de l'urée, l'uréase se présente sous la forme d'une poudre et elle est incorporée, au moment de l'emploi, soit dans la solution du colorant, soit dans une 30 solution d'eau physiologique, pour constituer alors le second réactif.

Pour l'application au dosage de l'urée dans les milieux biologiques, comme le sang ou les urines, la concentration en colorant dans la solution constituant le premier réactif peut aller de quelques micromoles à quelques 35 millimoles par litre, étant choisie notamment entre environ 0,1 et environ 5 mmole/l, et la concentration en uréase dans

le premier ou second réactif peut aller de quelques centaines à quelques milliers d'UI/l, et se situer notamment entre environ 1 000 et 50 000 UI/l.

La concentration du colorant varie en fonction de 5 la quantité maximale d'urée à doser. Ainsi, dans l'Exemple 2 ci-après, la quantité maximale est fixée à 500 mmol/l, l'échantillon est dilué au 1/111, soit une concentration de 4,5 mmol/l ; si le milieu n'était pas tamponné, il faudrait une concentration légèrement 10 supérieure à cette valeur ; comme il l'est un peu, une concentration à 2,5 mmol/l suffit.

La quantité d'uréase influe seulement sur la vitesse de la réaction avec 35 000 UI/l, celle-ci est 15 complète, même pour une concentration d'urée de 500 mmol/l, en moins de 5 minutes ; plus on diminuera la concentration d'uréase, plus la réaction sera longue.

(b) Dosage de l'uréase

Pour les applications à l'immuno-enzymologie et à 20 la biologie moléculaires, les conditions seront là fort différentes, l'uréase sera présente en très petite quantité puisqu'il n'y aura qu'une molécule d'uréase par molécule de produit recherché et celui-ci est le plus souvent en 25 quantité infime, en général inférieure à 1 UI/l ; en revanche, l'urée sera présente dans le premier ou le second réactif en une quantité connue, en étant comprise par exemple entre 1 et 50 mmol/l ; et le colorant devra être dans un milieu le moins tamponné possible pour avoir une bonne sensibilité et à une concentration de quelques micromoles à quelques millimoles/litre.

30 On effectue les mesures de densité optique à une longueur d'onde de 580 nanomètres par exemple.

35 L'ensemble, ou au moins le flacon de poudre d'uréase, doit être conservé entre 4° et 8°C ; il est ainsi utilisable après plusieurs mois. Grâce à cette disposition d'ensemble, on met au service de l'analyste un moyen de dosage simple rapide, efficace et peu coûteux.

Les exemples suivants sont destinés à illustrer la présente invention sans en limiter la portée.

Exemple 1 : Coffret de réactifs pour le dosage de l'urée

5

Ce coffret se compose des réactifs suivants :

- Réactif 1 (prêt à l'emploi) : solution aqueuse de
 - * pourpre de phtaléine 2,5 mmol/l
 - * tampon TRIS 30 mmol/l
 - * E D T A 5 mmol/l
 - * l'ensemble est ajusté à un pH de 7,4.
- Réactif 2 (poudre à dissoudre dans l'eau physiologique en mode bi-réactifs ou dans le réactif 1 en mode mono-réactif)
 - * uréase >35 000 U/l
- Réactif 3 (prêt à l'emploi) : standard urée
 - * urée 250 mmol/l

20

Différents conditionnements peuvent être envisagés :

25

| | Réactif 1 | Réactif 2 | Réactif 3 |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| grand | 500 ml | 50 ml | 5 ml |
| moyen | 250 ml | 25 ml | 5 ml |
| petit | 100 ml | 10 ml | 5 ml |

30

Exemple 2 : Dosage de l'urée dans les urines en mode bi-réactifs

35

Le réactif 2 est reconstitué par de l'eau physiologique (chlorure de sodium à 150 mmol/l) selon le conditionnement utilisé. Le photomètre est réglé à une longueur d'onde de 580 nm. Le dosage est conduit à une température allant de la température ambiante à 37°C environ.

Le mode opératoire figure dans le tableau ci-après.

| Introduire au fond des tubes à essai : | | | |
|--|---|-------------|--------------------|
| | Témoin Réactifs | Standard | Essai |
| 5 | Standard | — | 10 μ l |
| 10 | Echantillon d'urines | — | 10 μ l |
| 15 | Réactif 1 | 1 ml | 1 ml |
| 20 | Mélanger, incuber 1 minute et mesurer la densité optique (DO) à 580 nm contre le témoin | | DO _{1ét} |
| 25 | Réactif 2 | 100 μ l | 100 μ l |
| 30 | Mélanger, incuber 5 minutes et mesurer la DO à 580 nm contre le témoin | | DO _{2ét} |
| | | | DO _{2éch} |

- Calcul du résultat :

$$\frac{(DO_{2éch} - DO_{1éch})}{(DO_{2ét} - DO_{1ét})} \times \text{concentration du standard} \quad (230 \text{ mmol/l})$$

- Linéarité : 500 mmol/l

Exemple 3 : Dosage de l'urée dans le sang en mode bi-réactifs

On procède comme à l'Exemple 2, excepté que les volumes de standard et d'échantillon de sérum ou de plasma sont de 50 μ l, et que le standard urée doit être dilué au 1/10^e.

La linéarité est de 100 mmol/l.

Exemple 4 : Dosage de l'urée dans les urines ou dans le sang en mode mono-réactif

On procède comme à l'Exemple 2, excepté que le réactif 2 est reconstitué avec le réactif 1 (au lieu de l'eau physiologique).

| Introduire au fond des tubes à essai : | | |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | Standard | Essai |
| Standard | 10 µl (urines) ou 50 µl (sang) | — |
| Echantillon | | 10 µl (urines) ou 50 µl (sang) |
| Réactif | 1 ml | 1 ml |
| Mesurer la DO à 580 nm aussitôt après l'addition de réactif | DO _{lét} | DO _{léch} |
| Faire une deuxième mesure de DO 5 minutes plus tard | DO _{2ét} | DO _{2éch} |

- calcul du résultat :

$$\frac{(DO_{2éch} - DO_{léch})}{(DO_{2ét} - DO_{lét})} \times \text{concentration du standard}$$

- linéarité : 500 mmol/l pour les urines
100 mmol/l pour le sang.

Exemple 5 : Dosage de l'urée dans les urines ou dans le sang en mode cinétique

5

Introduire au fond des tubes à essai :

| | Standard | Essai |
|---|---|---|
| Standard | 10 μ l (urines) ou 50 μ l (sang) | — |
| Echantillon | | 10 μ l (urines) ou 50 μ l (sang) |
| Réactif (1+2) | 1 ml | 1 ml |
| Suivre la variation de DO entre T_0 (aussitôt après le mélange) et T_1 (1 minute plus tard) = DO | DO _{ét} | DO _{éch} |

- Calcul du résultat :

20

$$\frac{DO_{éch}}{DO_{ét}} \times \text{concentration du standard}$$

- Linéarité : 500 mmol/l (urines)
100 mmol/l (sang)

25

30

35

REVENDICATIONS

1 - Procédé pour le dosage de l'urée, ou de l'uréase dans les milieux liquides, en particulier dans les fluides biologiques, caractérisé par le fait qu'on mélange l'échantillon renfermant respectivement l'urée à doser ou l'uréase à doser avec un premier réactif essentiellement constitué par une solution aqueuse d'un composé chimique qui est stable dans ladite solution au moins pendant la durée du dosage, dont la coloration varie en fonction du pH, dans la plage de pH allant d'environ 5,5 à environ 9, ladite solution renfermant le cas échéant respectivement de l'uréase ou de l'urée, ladite uréase ou urée étant, dans la négative, ajoutée ultérieurement sous la forme d'une solution aqueuse et constituant alors un second réactif, et on déduit la concentration respectivement de l'urée ou de l'uréase recherchée de la différence des mesures de la densité optique de l'échantillon à une même longueur d'onde du spectre visible, effectuées avant et après l'action d'hydrolyse par l'uréase, cette différence étant comparée au résultat obtenu, dans les mêmes conditions, avec une solution étalon respectivement d'urée ou d'uréase.

2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que :

- dans une première étape, on mélange l'échantillon renfermant respectivement l'urée à doser ou l'uréase à doser avec un premier réactif essentiellement constitué par une solution d'un composé chimique dont la coloration varie en fonction du pH, dans la plage allant d'environ 5,5 à environ 9, ladite solution renfermant le cas échéant respectivement de l'uréase ou de l'urée;
- dans une seconde étape, on mesure la densité optique de l'échantillon ;
- dans une troisième étape, conduite dans le cas où le premier réactif ne contenait pas respectivement d'uréase ou d'urée, on ajoute à l'échantillon à traiter, un second réactif constitué par une solution

aqueuse respectivement d'uréase ou d'urée ; et

- dans une quatrième étape, on mesure à nouveau la densité optique de l'échantillon à la même longueur d'onde ; et
- 5 - on déduit la concentration respectivement d'urée ou d'uréase recherchée .

3 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'on suit la variation de la densité optique de l'échantillon et de la solution étalon.

10 4 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, pour le dosage de l'uréase, caractérisé par le fait que l'uréase est couplée à un anticorps ou à un antigène spécifique d'une molécule, telle qu'une hormone, une protéine, un médicament, que l'on veut doser.

15 5 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, pour le dosage de l'uréase, caractérisé par le fait que l'uréase est couplée à une sonde nucléique ADN ou ARN non-radioactive.

20 6 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé par le fait que le composé chimique dont la coloration varie en fonction du pH est un complexant métallique.

25 7 - Procédé selon la revendication 6, caractérisé par le fait que le complexant métallique est choisi parmi le pourpre de phtaléine, le rouge de pyrogallol, le bleu de méthyl thymol, le pourpre de bromocrésol, le bleu de toluidine et le bleu d'aniline.

30 8 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé par le fait que le composé chimique dont la coloration varie en fonction du pH est un indicateur coloré de pH.

35 9 - Procédé selon la revendication 8, caractérisé par le fait que l'indicateur coloré de pH est choisi parmi l'hématoxylène, le tournesol, le nitro-4 phénol, le bleu de bromoxylénol, l'alizarine, le bleu de bromothymol, le pourpre de crésol et la phénolphthaleine.

10 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé par le fait que la solution aqueuse constituant le premier réactif renferme au moins un agent complexant, tel que l'EDTA ou le NTA, en une quantité suffisante pour éviter toute interférence avec les métaux éventuellement présents dans le milieu.

11 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé par le fait que la solution aqueuse constituant le premier réactif est une solution tamponnée.

12 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, pour le dosage de l'urée ou de l'uréase, caractérisé par le fait que la concentration du composé chimique dont la coloration varie en fonction du pH dans la solution constituant le premier réactif est comprise entre quelques micromoles par litre et quelques millimoles par litre, notamment entre environ 0,1 à 5 mmoles/l.

13 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, pour le dosage de l'urée, caractérisé par le fait que la concentration en uréase dans le premier réactif ou le second réactif est comprise entre quelques millièmes et quelques milliers d'UI/l.

14 - Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que la concentration en uréase est comprise entre 1 000 et 50 000 UI/l.

15 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, pour le dosage de l'uréase, caractérisé en ce que la concentration en uréase est inférieure à 1 UI/l.

16 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, pour le dosage de l'uréase, caractérisé par le fait que la concentration en urée dans le premier ou second réactif est comprise entre environ 1 et 50 mmol/l.

17 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé par le fait qu'on effectue les mesures de densité optique à une longueur d'onde d'environ 580 nanomètres.

18 - Coffret des réactifs nécessaires pour la mise en œuvre du procédé tel que défini à l'une des revendications 1 à 3, et 6 à 14, pour le dosage de l'urée, caractérisé par le fait qu'il comprend :

- un flacon d'une solution d'un composé chimique dont la coloration varie en fonction du pH ;
- un flacon d'uréase en poudre ; et
- un flacon de solution étalon d'urée.

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | Revendications concernées de la demande examinée |
|--|---|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | |
| X | US-A-4 101 382 (M.K. CHANG) * Document en entier * | 1-3, 6- 18 |
| Y | --- | 4, 5 |
| Y | AU-B-7 867 881 (COMMONWEALTH SERUM LABORATORIES COMMISSION) * Document en entier * | 4, 5 , / |
| A | --- | 1-3, 6- 18 |
| X | FR-A-2 544 742 (LABORATOIRES BIOTROL) * Document en entier * | 1-3 |
| X | --- | |
| X | GB-A-2 030 295 (INSTITUTO SIEROTERAPICO E VACCINOGEN TOSCANO "SCLAVO S.p.A.") * Document en entier * | 1 |
| A | EP-A-0 054 096 (I.E. MODROVICH) ----- | |
| DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL5) | | |
| C 12 Q G 01 N | | |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examinateur |
| 19-07-1990 | | GRIFFITH G. |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire | | |
| T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant | | |